

申请号: 02111690.3      公开号: CN 1384116A

## 一种新型 $\alpha$ 干扰素

A new type of interferon- $\alpha$

### Abstract:

A new type of interferon- $\alpha$  which consists of 165 or 166 of amino acid residues. It's come from original interferon- $\alpha$  with mutation or permutation in one or several residues at opioid functional site such as, the Tyr122 (or Tyr123), Phe36 and Phe38, and Pro39. IFN- $\alpha$  one of those biologics been widely used in clinic. It is mainly used in treatment of viral disease such as, chronic hepatitis B, acute or chronic hepatitis C, verruca acuminata etc. and also been used as adjunctive drug in treatment of tumors and malignant hematopathy etc. But it will cause series of side-effects of neuroendocrine system such as, fever, anorexia, elevating pain threshold, rigidity etc. These side-effects all relates to opiate receptor. So in this invention, the structures of opioid functional sites were adjusted to reduce or eliminate its side-effects worked on neuroendocrine system.



附件 6f

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C07K 14/56

## [12] 发明专利申请公开说明书

A61K 38/21 A61P 31/12

A61P 35/00 A61P 7/00

[21] 申请号 02111690.3

[43] 公开日 2002 年 12 月 11 日

[11] 公开号 CN 1384116A

[22] 申请日 2002.5.16 [21] 申请号 02111690.3

[71] 申请人 中国人民解放军第二军医大学

地址 200433 上海市杨浦区翔殷路 800 号

[72] 发明人 蒋春雷 王云霞

[74] 专利代理机构 上海德昭专利事务所

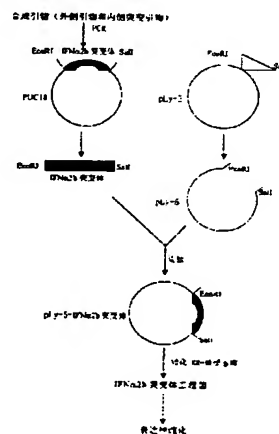
代理人 程宗德

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 2 页

[54] 发明名称 一种新型  $\alpha$  干扰素

[57] 摘要

本发明涉及医药生物工程技术领域,是一种新型  $\alpha$  干扰素。它由 165 或 166 个氨基酸残基组成,其为由原型  $\alpha$  干扰素的阿片样功能位点所在空间区域的第 122 位 (或 123 位) Tyr、第 36 和 38 位 Phe 以及第 39 位 Pro 中的任何一个氨基酸残基或几个氨基酸残基突变或置换为其它氨基酸残基而成。 $\alpha$  干扰素是目前临床上广泛应用的生物制品之一,主要治疗病毒性疾患,如慢性乙型肝炎、急性慢性丙型肝炎、尖锐湿疣等,以及作为肿瘤和恶性血液病的辅助治疗。但在临床使用过程中有发热、厌食、痛阈提高、嗜睡、强直等一系列神经内分泌系统毒副作用,这些毒副作用与阿片受体有关。本发明通过改变  $\alpha$  干扰素阿片样功能位点的结构,使其作用于神经内分泌系统所致的毒副作用减弱或消失。



1. 一种 $\alpha$ 干扰素, 由 165 或 166 个氨基酸残基组成, 其特征在于其为由原型 $\alpha$ 干扰素的阿片样功能位点所在空间区域的第 122 位 (或 123 位) Tyr、第 36 和 38 位 Phe 以及第 39 位 Pro 中的任何一个氨基酸残基或几个氨基酸残基突变或置换为其它氨基酸残基而成。
2. 按权利要求 1 所述的 $\alpha$ 干扰素, 其特征在于第 36 位的氨基酸残基为 Ser。
3. 按权利要求 1 所述的 $\alpha$ 干扰素, 其特征在于第 38 位的氨基酸残基为 Leu。
4. 按权利要求 1 所述的 $\alpha$ 干扰素, 其特征在于第 39 位的氨基酸残基为 Gly。
5. 按权利要求 1 所述的 $\alpha$ 干扰素, 其特征在于第 122 位的氨基酸残基为 Ser。
6. 按权利要求 1 所述的 $\alpha$ 干扰素, 其特征在于第 36 位的氨基酸残基为 Ser, 第 38 位的氨基酸残基为 Leu。
7. 按权利要求 1 所述的 $\alpha$ 干扰素, 其特征在于第 38 位的氨基酸残基为 Leu, 第 39 位的氨基酸残基为 Gly。
8. 按权利要求 1 所述的 $\alpha$ 干扰素, 其特征在于第 38 位的氨基酸残基为 Leu, 第 122 位的氨基酸残基为 Ser。
9. 按权利要求 1 所述的 $\alpha$ 干扰素, 其特征在于第 36 位的氨基酸残基为 Ser, 第 39 位的氨基酸残基为 Gly。
10. 权利 1~9 所述 $\alpha$ 干扰素用于制备治疗病毒性疾患、肿瘤和恶性血液病的药物的用途。

一种新型 $\alpha$ 干扰素

技术领域：本发明涉及医药生物工程技术领域，是一种新型的 $\alpha$ 干扰素。

背景技术： $\alpha$ 干扰素（IFN $\alpha$ ）是目前临床上广泛应用的生物制品之一，主要治疗病毒性疾患，如慢性乙型肝炎、急慢性丙型肝炎、尖锐湿疣等，以及作为肿瘤和恶性血液病的辅助治疗。但是，在临床使用过程中有发热、厌食、粒细胞减少以及其它神经内分泌系统毒副作用。IFN $\alpha$ 临床应用所致的发热，有其本身的结构基础和受体机制，IFN $\alpha$ 能够透过血脑屏障薄弱环节处而作用于中枢神经系统，能够直接作用于阿片受体而改变视前区一下丘脑前部热敏和冷敏神经元放电频率。IFN $\alpha$ 作用于神经内分泌系统所致的其它毒副作用，如厌食、痛阈提高、嗜睡、强直等都与阿片受体有关。

## 发明内容：

IFN $\alpha$ 有许多亚型组成，它们是含有 165 或 166 个氨基酸残基的蛋白质分子[侯健，王东星，胥军民。人类细胞因子手册。1996，上海，同济大学出版社，1]。本发明人发现，该分子存在着与免疫调节功能位点相互独立的阿片样功能位点，介导阿片样神经调节作用。如 IFN $\alpha$ 2b，由 165 个氨基酸残基组成，阿片样功能位点位于第 122 位 Tyr 残基附近的区域，由第 122 位 Tyr、空间结构与之相近的第 36 和 38 位 Phe 以及第 39 位 Pro 共同构成。又如 IFN $\alpha$ 1b，则由 166 个氨基酸残基组成，其阿片样功能位点位于第 123 位 Tyr 残基所处的空间结构附近，包括第 123 位 Tyr、第 36 和 38 位 Phe 以及第 39 位 Pro。IFN $\alpha$ 的阿片样作用主要是由 IFN $\alpha$ 分子阿片样功能位点作用于阿片受体所致。本发明通过改变 IFN $\alpha$ 阿片样功能位点的结构，从而达到降低其作用于神经内分泌系统所致的毒副作用。

本发明对 IFN $\alpha$ 阿片样功能位点结构的改变，是采用基因定位突变来实现的。基因定位突变方法参照 White 的方法进行[White BA. PCR cloning protocols. Totowa, New Jersey, Humana Press, 1997, 141]。将编码 IFN $\alpha$ 阿片样功能位点氨

氨基酸残基的密码子,突变为其它氨基酸残基的密码子,就能改变其阿片样功能位点的结构。既可改变其中任何一个氨基酸残基的密码子,也可同时改变两个或三个或四个氨基酸残基的密码子,都可达到降低 IFN $\alpha$ 毒副作用的目的。

具体操作步骤包括:

1. IFN $\alpha$ 的基因定位突变

(1)引物合成:根据重组 PCR 原理,除合成外侧引物外,还根据突变体的不同合成相应的内侧引物,引入突变位点。

(2)以 IFN $\alpha$ 基因为模板,外侧引物与相应的内侧突变引物组合,进行 PCR 扩增,分别形成短 PCR 产物。然后以相对应的两个短 PCR 产物为模板,再以两个外侧引物,进行第二次 PCR 反应,由此获得 PCR 产物。

2. 构建 IFN $\alpha$ 突变体表达质粒:PCR 产物经纯化、测序鉴定后,与表达质粒 pLy-5 连接,获得表达质粒 pLy-5-IFN $\alpha$ 。

3. 构建 IFN $\alpha$ 突变体工程菌:将表达质粒 pLy-5-IFN $\alpha$ 转入大肠杆菌 RR-感受态菌,即得 IFN $\alpha$ 突变体工程菌。

4. 制备 IFN $\alpha$ 突变体蛋白:培养 IFN $\alpha$ 突变体工程菌,离心收集菌体,超声波破碎,采用亲和层析方法进行纯化,获得 IFN $\alpha$ 突变体蛋白。

将所得的 IFN $\alpha$ 突变体蛋白,采用细胞病变抑制法[Van Heuvel M, et al. J Gen Virol, 1986; 67: 2215]、电刺激甩尾法[Jiang CL, et al. Neurochem Int, 2000; 36(3): 193]等,检测其抗病毒活性、阿片样镇痛活性;同时,测定其对细胞内 cAMP 含量的影响、对下丘脑脑片 PGE2 释放的影响以及致热作用[Zawada WM, et al. Neurochem Int, 1997; 30: 441]等。结果表明,通过改变 IFN $\alpha$ 阿片样功能位点的结构,即置换或突变构成 IFN $\alpha$ 阿片样功能位点的第 122 位(或 123 位) Tyr、第 36 和 38 位 Phe 以及第 39 位 Pro 中的任何一个氨基酸残基,或几个氨基酸残基的不同组合的突变或置换,其阿片样镇痛作用明显减弱甚至消失,进而因 IFN $\alpha$ 作用于神经内分泌系统所致的发热等毒副作用明显减弱甚至消失,且部分 IFN $\alpha$ 突变体的抗病毒活性等免疫学活性无明显影响甚至活性增强。

附图说明:

图 1 为 IFN $\alpha$ 2b 分子立体结构示意图。图中 CA-122、CA-36、CA-38 和 CA-39

分别表示第 122 位、第 36 位、第 38 位和第 39 位氨基酸残基所在的空间位置，此区域即为 IFN $\alpha$ 2b 的阿片样功能位点。

图 2 为制备 38Leu-IFN $\alpha$ 2b 突变体流程示意图。

#### 具体实施方式：

实施例 1：制备 38Leu-IFN $\alpha$ 2b 突变体（参见图 2）。38Leu-IFN $\alpha$ 2b 突变体即将 IFN $\alpha$ 2b 第 38 位 Phe 残基突变为 Leu 残基。

基因定位突变方法参照 White 的方法进行[White BA. PCR cloning protocols. Totowa, New Jersey, Humana Press, 1997, 141]。其基本原理是重叠延伸，即两种 PCR 产物序列一端重叠，其重叠是通过两个互补的内侧引物造成的以获得定点突变的基因。这两个引物分别在相同的位置加入替换的碱基，也就是由 PCR 引物引入同样的突变位点，除去未掺入的多余的引物后，两种产物变性混合，可形成 3' 凹端的异源双链。这种 3' 凹端可由 TaqDNA 多聚酶延伸产生一个两重叠产物的重组体。该重组体可由两片段的外侧引物进行 PCR 扩增。由此，可产生一种远离片段末端的突变体。具体步骤如下：

##### 1. 合成引物：按常规合成下列引物：

外侧引物 1：5' CGGAATTCAT GCAGGAC3'

外侧引物 2：5' CGCGGTCGACTCATTCTTACT3'

内侧突变引物 1：5' CTCCTCCTGGGGTAATCCAAAGTC3'

内侧突变引物 2：5' CATGACTTTGGATTACCCCAGGAG3'

在内侧突变引物中，引入了亮氨酸密码子 TTA，以便将 IFN $\alpha$ 2b 第 38 位 Phe 突变为 Leu。

##### 2. IFN $\alpha$ 2b 的基因定位突变：

以 IFN $\alpha$ 2b 基因为模板，外侧引物 1 与内侧突变引物 1 组合，进行 PCR 扩增，形成短 PCR 产物。同样，外侧引物 2 与内侧突变引物 2 组合，形成另一短 PCR 产物。通过胶上回收短 PCR 产物，以相对应的两个短 PCR 产物为模板，再以两个外侧引物，进行第二次 PCR 反应，由此获得突变体基因。

PCR 反应体系为：

Taq 酶	2.5 单位
H <sub>2</sub> O	30 $\mu$ l

buffer	10 $\mu$ l
2.5mM dNTP	8 $\mu$ l
引物 1	5 $\mu$ l (50pmol)
引物 2	5 $\mu$ l (50pmol)
模板	10 $\mu$ l
加 H <sub>2</sub> O	至 100 $\mu$ l

PCR 反应的条件为:

94℃10 分钟; 72℃2 分钟; 94℃30 秒, 45℃45 秒, 72℃1 分钟 30 秒, 共 30 个循环; 72℃7 分钟; 最后保持于 4℃。

PCR 的反应液用同体积的氯仿抽提 1 次后, 经 1% 的琼脂糖电泳。割下 600bp 左右电泳胶带, 利用基因公司试剂盒回收、纯化 DNA 片段。将获得的 DNA 片段与 T 载体进行连接, 然后转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 转化混合物涂布于含 2% X-gal 的 LB 氨苄青霉素平板上。挑取若干白色单菌落, 培养扩增后进行质粒抽提, 再经 EcoRI、SalI 双酶切, 以 1% 琼脂糖凝胶电泳, 初步鉴定出含有上述 600bp 左右的 DNA 片段的相应转化子。挑取这些转化子的单菌落, 由中科院植物生理研究所进行 DNA 序列测定, 筛选出含正确序列的突变体 38Leu-IFN $\alpha$ 2b。

### 3. 构建突变体表达质粒 pLy-5-38Leu-IFN $\alpha$ 2b:

将含正确序列 38Leu-IFN $\alpha$ 2b 基因的 T 载体质粒与表达质粒 pLy-5 分别用 EcoRI、SalI 双酶切, 酶切后的反应液以 1% 琼脂糖凝胶电泳, 待 DNA 片段分离开后, 在紫外灯下分别切下 38Leu-IFN $\alpha$ 2b 突变基因和表达质粒 pLy-5 对应胶带, 用基因公司试剂盒回收、纯化 DNA。将回收的 38Leu-IFN $\alpha$ 2b DNA 片段和 pLy-5 表达载体按分子数 10:1 比例混合, 加入 T4 DNA 连接酶, 16℃连接过夜后转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。随机挑取单菌落扩大培养, 并抽提质粒, 用 EcoRI 和 SalI 再经酶切鉴定, 获得突变体表达质粒 pLy-5-38Leu-IFN $\alpha$ 2b。

4. 构建 38Leu-IFN $\alpha$ 2b 突变体工程菌: 将表达质粒 pLy-5-38Leu-IFN $\alpha$ 2b 转入感受态大肠杆菌 RR-, 即得 38Leu-IFN $\alpha$ 2b 突变体工程菌。

### 5. 制备 38Leu-IFN $\alpha$ 2b 突变体蛋白:

将突变体 38Leu-IFN $\alpha$ 2b 工程菌接种于 50ml M9 培养基, 在 37℃培养过夜, 以 1:20 转接于含 0.2% 酪蛋白的 500ml M9 培养基中, 37℃培养至菌体浓度 A600 为 1.0, 离心收集菌体, 并悬浮于 100ml 的 0.01M pH 为 7.4 的磷酸缓冲液, 超声波破碎后离心, 上清采用亲和层析方法进行纯化 (亲和层析柱购自安徽安



科生物高技术有限公司)。纯化过程中的洗涤液为含 0.4% Tween20 的 1M NaCl, 洗脱液为 0.02M HAc、0.135M NaCl。最后获得纯化的 38Leu-IFN $\alpha$ 2b 突变体蛋白, 即本发明的 $\alpha$ 干扰素, 并进行以下检测:

1. 采用常规的细胞病变抑制法, 测定 38Leu-IFN $\alpha$ 2b 的抗病毒活性[详见 Van Heuvel M, et al. J Gen Virol, 1986; 67: 2215], 发现其保留了很强的抗病毒活性, 为天然重组 IFN $\alpha$ 2b 的 71%。

2. 动物实验检测 38Leu-IFN $\alpha$ 2b 的镇痛活性: 取雄性 SD 大鼠(购自上海计划生育研究所), 体重为 160~180g, 用侧脑室埋管给药、电刺激甩尾法观察 38Leu-IFN $\alpha$ 2b 突变体对大鼠痛阈的影响, 来测定其阿片样镇痛活性[详见 Jiang CL, et al. Neurochem Int, 2000; 36(3): 193], 发现阿片样镇痛活性完全消失。

3. 将突变体 38Leu-IFN $\alpha$ 2b 与转染了 $\mu$ 阿片受体的中国仓鼠卵巢细胞(中国科学院上海细胞生物研究所)孵育, 测定对细胞内 cAMP 含量的影响(cAMP 测定试剂盒购自上海中医药大学同位素实验室), 发现 38Leu-IFN $\alpha$ 2b 对环腺苷酸(cAMP)含量无明显影响。

4. 采用出生 5~7 天的 SD 新生鼠, 培养下丘脑脑片[Scott IM, et al. Am J Physiol. 1987; 253(1 Pt 2): R71], 测定 38Leu-IFN $\alpha$ 2b 突变体对下丘脑脑片 PGE2 释放的影响(PGE2 测定试剂盒购自北京邦定生物公司), 发现 38Leu-IFN $\alpha$ 2b 对前列腺素 E2(PGE2)的释放无明显影响。

5. 采用侧脑室埋管给药的方式, 测定 38Leu-IFN $\alpha$ 2b 突变体对大鼠直肠温度的变化[Zawada WM, et al. Neurochem Int, 1997; 30: 441], 发现 38Leu-IFN $\alpha$ 2b 致热作用消失。

实施例 2: 制备 39Gly-IFN $\alpha$ 2b 突变体(参见图 2)。39Gly-IFN $\alpha$ 2b 突变体即将 IFN $\alpha$ 2b 第 39 位 Pro 残基突变为 Gly 残基。

合成内侧突变引物如下:

引物 1: 5' CTCCTCCTGCCGAAATCCAAAGTC3'

引物 2: 5' GACTTTGGATTTGGCCAGGAGGAG3'

在内侧突变引物中, 引入了甘氨酸密码子 GGC, 以便将 IFN $\alpha$ 2b 第 39 位 Pro 突变为 Gly。其它操作步骤同实施例 1。结果发现 39Gly-IFN $\alpha$ 2b 抗病毒活性增加

为天然重组人 IFN $\alpha$ 2b 的 130%，而阿片样镇痛作用消失，发热等毒副作用也消失。

实施例 3：制备 122Ser-IFN $\alpha$ 2b 突变体（参见图 2）。122Ser-IFN $\alpha$ 2b 突变体即将 IFN $\alpha$ 2b 第 122 位 Tyr 残基突变为 Ser 残基。

合成内侧突变引物如下：

引物 1：5' GATTCTTTGGAAGGATTTCCTCACAGC 3'

引物 2：5' GCTGTGAGGAAATCCTTCCAAAGAATC3'

在内侧突变引物中，引入了丝氨酸密码子 TCC，以便将 IFN $\alpha$ 2b 第 122 位 Tyr 突变为 Ser。其它操作步骤同实施例 1。结果发现 122Ser-IFN $\alpha$ 2b 的阿片样镇痛作用和发热等毒副作用消失。

实施例 4：制备 36Ser-IFN $\alpha$ 2b 突变体（参见图 2）。36Ser-IFN $\alpha$ 2b 突变体即将 IFN $\alpha$ 2b 第 36 位 Phe 残基突变为 Ser 残基。

合成内侧突变引物如下：

引物 1：5' CTGGGGAAATCCAGAGTCGTCATG3'

引物 2：5' AGACATGACTCTGGATTTCCTCCAGGAG3'

在内侧突变引物中，引入了丝氨酸密码子 TCT，以便将 IFN $\alpha$ 2b 第 36 位 Phe 突变为 Ser。其它操作步骤同实施例 1。结果发现 36Ser-IFN $\alpha$ 2b 的阿片样镇痛作用和发热等毒副作用消失。

实施例 5：制备 38Leu-39Gly-IFN $\alpha$ 2b 突变体（参见图 2）。38Leu-39Gly-IFN $\alpha$ 2b 突变体即将 IFN $\alpha$ 2b 第 38 位 Phe 残基突变为 Leu 残基，第 39 位 Pro 残基突变为 Gly 残基。

合成内侧突变引物和其它操作步骤同实施例 1 和 2。结果发现 38Leu-39Gly-IFN $\alpha$ 2b 的阿片样镇痛作用和发热等毒副作用消失。

实施例 6：制备 38Leu-122Ser-IFN $\alpha$ 2b 突变体（参见图 2）。38Leu-122Ser-IFN $\alpha$ 2b 突变体即将 IFN $\alpha$ 2b 第 38 位 Phe 残基突变为 Leu 残基，第 122 位 Tyr 残基突变为 Ser 残基。

合成内侧突变引物和其它操作步骤同实施例 1 和 3。结果发现 38Leu-122Ser-IFN $\alpha$ 2b 的阿片样镇痛作用和发热等毒副作用消失。

实施例 7：制备 36Ser-38Leu-IFN $\alpha$ 2b 突变体（参见图 2）。36Ser-38Leu-IFN $\alpha$ 2b 突变体即将 IFN $\alpha$ 2b 第 36 位 Phe 残基突变为 Ser 残基，第 38 位 Phe 残基突变为 Leu 残基。

合成内侧突变引物和其它操作步骤同实施例 1 和 4。结果发现 36Ser-38Leu-IFN $\alpha$ 2b 的阿片样镇痛作用和发热等毒副作用消失。

实施例 8：制备 39Gly-122Ser-IFN $\alpha$ 2b 突变体（参见图 2）。39Gly-122Ser-IFN $\alpha$ 2b 突变体即将 IFN $\alpha$ 2b 第 39 位 Pro 残基突变为 Gly 残基，第 122 位 Tyr 残基突变为 Ser 残基。

合成内侧突变引物和其它操作步骤同实施例 2 和 3。结果发现 39Gly-122Ser-IFN $\alpha$ 2b 的阿片样镇痛作用和发热等毒副作用消失。

实施例 9：制备 36Ser-39Gly-IFN $\alpha$ 2b 突变体（参见图 2）。36Ser-39Gly-IFN $\alpha$ 2b 突变体即将 IFN $\alpha$ 2b 第 36 位 Phe 残基突变为 Ser 残基，第 39 位 Pro 残基突变为 Gly 残基。

合成内侧突变引物和其它操作步骤同实施例 2 和 4。结果发现 36Ser-39Gly-IFN $\alpha$ 2b 的阿片样镇痛作用和发热等毒副作用消失。

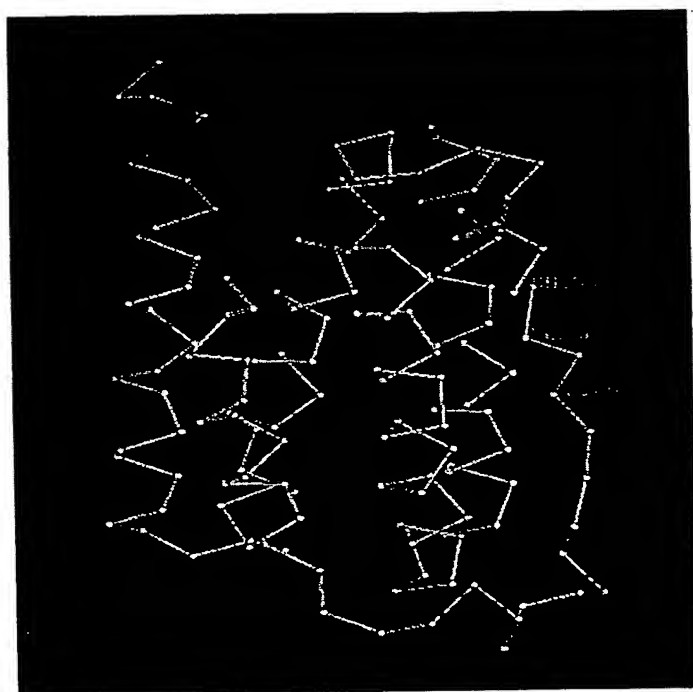


图 1

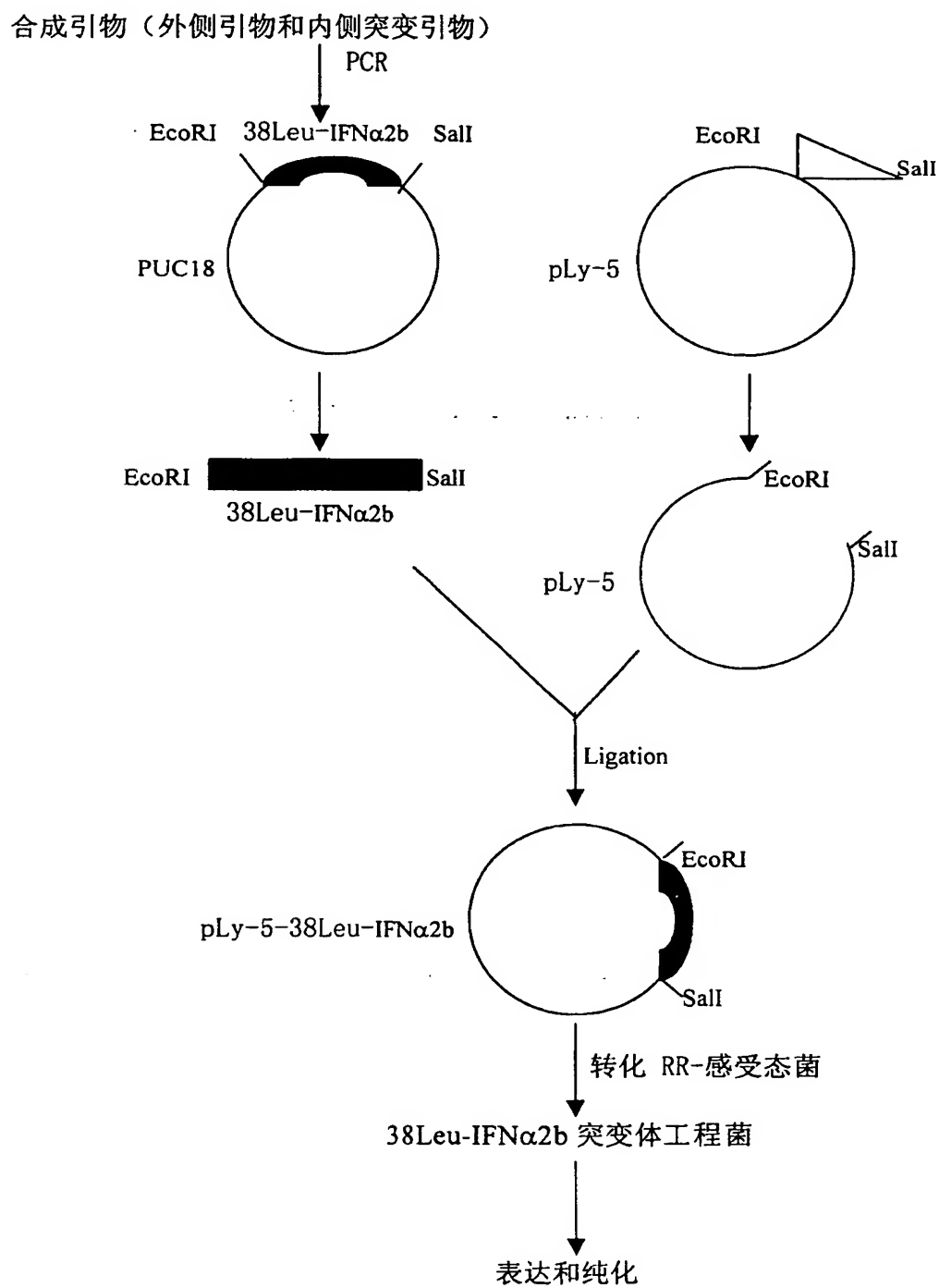


图 2

